

Utilisation de savons pour la production de levures aliments

F. MARTINET (1), A. BA (1), R. RATOMAHENINA (1), J. GRAILLE (2) et P. GALZY (1)

Résumé. — Dans le cadre de la valorisation des sous-produits et déchets des raffineries d'huiles végétales, il est proposé de cultiver des levures alimentaires sur les pâtes de neutralisation et sur la stéarine de l'huile de palme après conversion en savons d'ammonium ou de sodium. Les paramètres de croissance de différentes souches de levures ont été déterminés. Les résultats montrent que les souches étudiées sont convenables pour la production industrielle de protéines d'organismes unicellulaires à partir de ces substrats.

INTRODUCTION

Les pâtes de neutralisation sont un sous-produit important du raffinage des corps gras. Ce sous-produit représente environ 5 p. 100 en poids si on l'exprime en matière grasse éliminée au raffinage par rapport à la matière première.

Le raffinage a concerné 750 000 t d'huiles et graisses (végétales et animales) en 1981 en France et 1 500 000 t en Malaisie (essentiellement de l'huile de palme) ; ces deux chiffres mettent en évidence l'importance de ce sous-produit.

Si les pâtes de neutralisation sont une des sources d'approvisionnement de l'industrie des acides gras dans les pays industrialisés, il n'en est pas de même dans les pays en développement comme la Malaisie, l'Indonésie, les Philippines, l'Afrique de l'Ouest, etc.

Dans un pays comme la Malaisie, il existe de plus un co-produit, la stéarine de palme ou concret de palme, issu du fractionnement de l'huile entière.

Rappelons que le fractionnement est nécessaire à l'obtention d'une huile alimentaire fluide [1, 2], mais la co-production de stéarine avec un volume de 40 p. 100 environ par rapport à l'huile fractionnée en est l'inconvénient majeur du fait qu'il ne trouve pas de débouchés satisfaisants dans ce pays [3].

La partie concrète de l'huile de palme, essentiellement composée de triglycérides, d'acides gras saturés, est utilisée dans l'industrie de la margarine en Europe, mais est pauvrement valorisée en Malaisie, qui en est le principal producteur (2 à 2,5 millions de t pour 1983).

Pour les pays en développement, qui raffinent des tonnages de plus en plus importants, il est nécessaire d'essayer de valoriser les co-produits et sous-produits résultants. Le but de cet article est de montrer qu'il est possible de les utiliser pour la production de protéines d'organismes unicellulaires et de promouvoir ainsi une nouvelle source d'aliments aussi bien pour l'homme que pour les animaux.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — Matériel biologique.

Les souches de levures étudiées ici ont été fournies, en partie, par le Centraal Bureau voor Schimmelcultuur (CBS), Yeast Division, Delft (Pays-Bas). Ces souches sont : *Candida rugosa* CBS 613, *Candida tropicalis* CBS 644, *Candida tropicalis* CBS 5696, *Candida utilis* CBS 5609 et *Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317. Cette dernière, ainsi que deux autres souches provenant de la Northern Utilisation Research and Development Division, US Department of Agriculture, Peoria (Illinois) : *Candida lipolytica* YB 423-3 et *Candida lipolytica* YB 423-12 possèdent une forte activité lipasique.

Ces levures sont réputées à croissance rapide et sont déjà utilisées ou admises en levurerie.

2. — Conditions de culture.

Milieux de cultures.

Les études ont été réalisées sur les milieux suivants :

- YE-glucose, composé d'extrait de levure Difco (0,5 p. 100) et de glucose (0,5 p. 100) ;
- YNB-savons, composé de Yeast Nitrogen Base Difco (0,67 p. 100) et de savons de sodium ou d'ammonium à différentes concentrations.

Ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 110 °C pendant 30 min à l'exception du YNB qui l'est par filtration sur filtre Millipore (0,45 µm) et ajouté avant ensemencement.

Techniques de cultures.

Toutes les cultures sont effectuées en milieu liquide, dans des fioles d'Erlenmeyer remplies au 1/10^e de leur volume. Celles-ci sont agitées (80 oscillations/min, amplitude 7 cm) pour assurer une aération convenable, et thermostatées à 28 °C.

3. — Techniques analytiques.

La courbe de croissance est établie par lecture, en fonction du temps, de la densité optique, de la lecture à l'aide

(1) I.N.R.A.-E.N.S.A. Chaire de Génétique et de Microbiologie, 9 Place Viala, 34060 Montpellier, Cedex (France).

(2) I.R.H.O.-GERDAT. Département Chimie des Corps Gras, BP 5035, 34032 Montpellier, Cedex (France).

d'un Colorimètre Klett et Summerson équipé d'un filtre sélectionnant une gamme de longueurs d'onde variant de 400 à 450 nm.

La matière sèche est déterminée par pesée jusqu'à poids constant, après dessiccation à 108 °C d'une solution aqueuse de cellules préalablement lavées.

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Strickland [4].

Le dosage des acides aminés est réalisé selon la méthode décrite par Ba *et al.* [5].

Ces techniques ont été décrites en détail par Martinet [6].

4. — Préparation et dosage des savons.

Préparation des savons.

La transformation du concret en savons d'ammonium se déroule en trois étapes :

- la saponification du concret par la potasse alcoolique ou hydrolyse alcaline permettant la transformation des triglycérides en savons de potassium des acides gras correspondants et en glycérol ;

- la décomposition des savons de potassium par un acide minéral fort et l'extraction à l'aide d'un solvant des acides gras formés. L'extrait est lavé par de l'eau permutee jusqu'à neutralité. Ce lavage élimine tous les sous-produits hydrosolubles dont le glycérol ;

- la formation de savons d'ammonium à partir des acides gras extraits.

Pendant 1 h 45, 100 g de concret sont saponifiés par 1 litre de potasse alcoolique N (alcool à 96 p. 100). On transfère dans une ampoule de 4 l contenant 1 l d'HCl 4 N. Les acides gras ainsi libérés sont extraits par de l'hexane (3 fois 500 ml). Les extraits sont réunis dans une ampoule puis lavés à neutralité par de l'eau permutee. On sèche sur sulfate de sodium, puis on chasse l'hexane par distillation d'abord sous pression atmosphérique puis sous pression réduite jusqu'à poids constant. L'indice d'acide est effectué sur une aliquote que l'on dissout dans un mélange 1/1 (en volume) d'alcool et d'éther diéthylique préalablement neutralisé par de la potasse en présence de phénolphthaléine (solution à 1 p. 100 dans l'éthanol à 96 p. 100). On titre par de la potasse alcoolique N/10 de titre connu. On détermine ainsi l'indice d'acide en mg de potasse nécessaire pour neutraliser l'acidité de 1 g de corps gras :

$$I_A = \frac{V \times 56,1 \times N}{P}$$

— V = volume de KOH utilisé en cm³.

— N = normalité.

— P = poids de la prise d'essai en g.

On peut également l'exprimer en millifonctions acides par g de corps gras :

$$M_A = \frac{V \times N}{P}$$

Le calcul de cet indice permet de déterminer la quantité de base nécessaire pour la saponification.

La préparation de savons de sodium à partir des acides gras dérivant, soit du concret d'huile de palme, soit des pâtes de neutralisation, s'effectue suivant le même protocole.

Dosage des savons dans le résidu de culture.

La filtration, sur membrane Millipore (0,45 µm) et sous pression réduite, d'un mélange 50/50 en volume du milieu de culture et d'éthanol à 95°, permet de retenir les cellules de levures. Les savons contenus dans la solution hydro-alcoolique sont dosés sous forme d'acides gras.

Ce dosage nécessite l'élimination préalable, sous pression réduite, de l'excès d'éthanol. La solution est alors acidifiée par une solution d'acide chlorhydrique 4 N et les acides gras obtenus sont extraits à l'hexane (3 × 20 ml). La matière organique pesée est remise en solution dans un volume connu d'hexane. Les acides gras sont ensuite dosés par chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, on utilise un étalon interne, l'acide margarique ou acide heptadécanoïque, C 17 : 0. L'acide margarique est introduit en solution dans l'hexane au moment de la formation des esters méthyliques des acides gras de telle sorte que le rapport acide margarique/acides gras à doser (P/P) soit voisin de 1/2 mais connu avec précision.

L'estérification est effectuée, après évaporation de l'hexane, en présence de 10 ml de méthanol chlorhydrique. La réaction se fait pendant 15 min à ébullition dans un bain-marie chauffé à 80 °C. Après refroidissement, 40 ml d'eau permutee sont ajoutés au milieu.

Les esters méthyliques sont alors extraits à l'hexane. Après évaporation du solvant, les esters méthyliques sont repris dans un faible volume d'hexane. Quelques microlitres de cette solution serviront à l'analyse.

Les esters méthyliques sont dosés par chromatographie en phase gazeuse, sur une colonne capillaire préparée selon la méthode de Grob [7] (phase stationnaire = carbowax 20M, longueur de la colonne = 10 m, diamètre intérieur = 0,2 mm, épaisseur du film = 0,1 µm environ). L'appareil utilisé est un chromatographe Girdel 300 muni d'un injecteur diviseur et d'un détecteur à ionisation de flamme (température de l'injecteur et du détecteur = 275 °C, température du four = 180 °C). L'hélium, ou l'hydrogène suivant le cas, est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 1,5 bar, soit un débit de 2 cm³/min environ. Le chromatogramme est enregistré à la vitesse de 5 mm/min sur un enregistreur Servotrace Safram.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. — Sélection des souches.

Cette sélection a été effectuée sur concret d'huile de palme [6]. Les résultats sont présentés dans le tableau I.

Toutes les souches étudiées se montrent capables d'utiliser les savons d'ammonium dérivant des acides gras du concret d'huile de palme. Les temps de génération déterminés à partir de courbes de croissance (Fig. 1, 2) vont de 1,5 h pour la souche de *S. lipolytica* CBS 6317 à 4 h pour *C. tropicalis* CBS 644. Ces temps de génération sont compatibles avec une utilisation industrielle de ces souches. Par ailleurs, le pH des milieux de culture, en fin de croissance des levures, atteint des valeurs inférieures à 3, ce qui est normal en présence de Yeast Nitrogen Base car ce milieu n'est pas très bien tamponné. De ce fait, la croissance s'arrête avant la consommation totale du substrat initialement introduit.

Dans un premier temps, les rendements de croissance ont été déterminés en présence de savons d'ammonium à des concentrations variant de 0,025 p. 100 à 1,5 p. 100 (p/v). La biomasse obtenue pour chaque concentration de substrat a été mesurée.

TABLEAU I. — Temps de génération (en heures) et rendements de croissance de diverses souches sur savons d'ammonium dérivant du concret d'huile de palme (exprimés en g par rapport à 1 g de substrat initial — savons d'ammonium)

Souches de levures	Temps de génération (en heures)	Rendement en mat. sèche (en g)	Rendement en protéines (en g)
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-3	2,5	0,67	0,36
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12	2	0,80	0,45
<i>Candida rugosa</i> CBS 613	2,5	0,40	0,25
<i>Candida tropicalis</i> CBS 644	4	0,70	0,33
<i>Candida tropicalis</i> CBS 5696	2	0,75	0,42
<i>Candida tropicalis</i> CBS 6320	3	0,70	0,30
<i>Candida utilis</i> CBS 5609	3	0,60	0,20
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317	1,5	0,50	0,30

Cette méthode, avec ce substrat, n'est pas très bonne car la zone de non-proportionnalité entre la biomasse et la concentration en substrat est très vite atteinte. En effet, la chute rapide du pH limite la croissance qui s'arrête. De ce fait, il reste toujours du substrat dans le milieu de culture, même en fin de croissance des souches.

Le tableau II indique les rendements de croissance en matière sèche et en protéines par rapport au substrat réellement consommé par les souches.

Les analyses effectuées sur les résidus de culture montrent que, dans tous les cas, les acides gras insaturés C18 : 2 et C18 : 1 sont consommés plus vite que les acides gras saturés C18 : 0, C16 : 0 et C14 : 0.

Les valeurs du tableau II indiquent que les rendements en matière sèche et en protéines de certaines de ces souches sont excellents. Cependant, au niveau industriel, il faudra innover des conditions de cultures où tout le substrat sera consommé. Cet objectif sera facile à atteindre: il faudra probablement réguler le pH de manière à ne jamais atteindre le pH d'arrêt de la croissance.

La caractéristique essentielle d'une levure aliment est sa richesse en protéines d'une part et une bonne composition des acides aminés essentiels d'autre part.

Le tableau III donne la composition de quelques aliments. Il apparaît que la levure est riche en certains acides aminés essentiels : lysine, thréonine, tryptophane. C'est donc un excellent additif à la ration pour compenser, par exemple, la faible teneur des céréales en ces acides aminés.

Le tableau IV donne, pour les souches testées ici, la teneur des cellules en protéines, ainsi que leur teneur en différents acides aminés.

Ces résultats indiquent que toutes les souches étudiées ici sont riches en acides aminés essentiels.

TABLEAU II. — Rendements réels en matière sèche et en protéines des souches de levures cultivées sur YNB (0,67 p. 100) et savons d'ammonium dérivant d'acides gras du concret de palme

Souches	Rendement en matière sèche	Rendement en protéines
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-3	0,95	0,51
<i>Candida lipolytica</i> YB 423-12	1,23	0,75
<i>Candida rugosa</i> CBS 613	1,36	0,65
<i>Candida tropicalis</i> CBS 644	1,49	0,63
<i>Candida tropicalis</i> CBS 5696	1,23	0,70
<i>Candida tropicalis</i> CBS 6320	1,36	0,60
<i>Candida utilis</i> CBS 5609	0,90	0,40
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i> CBS 6317	1,06	0,57

TABLEAU III. — Composition en acides aminés des protéines des aliments, suivant R. J. Block et D. Bolling, Editions Thomas 1947

	Oeuf (étalon)	Lait	Levure	Farine blanche
Arginine	6,4	4,3	4,3	3,9
Histidine	2,1	2,5	2,8	2,2
Lysine	7,2	7,5	7,5*	1,9
Tyrosine	4,5	5,3	4,2	3,8
Tryptophane	1,5	1,6	1,3	0,8
Phénylalanine ...	6,3	5,7	4,1	5,5
Cystine	2,4	0,7	1,1	1,9
Méthionine	4,1	3,7	2	3
Thréonine	4,9	4,6	5,5	2,7
Leucine	9,2	11,3	7,3	9,1
Isoleucine	8	6,2	6	4,5
Valine	7,3	6,6	5,3	5

(*) Dans certains échantillons français, on a trouvé jusqu'à 9,9 p. 100 de lysine.

2. — Etude des conditions d'utilisation de *Candida lipolytica* YB 423-12.

Les résultats obtenus sur savons d'ammonium conduisent à retenir *Candida lipolytica*, YB 423-12 comme une des souches les plus intéressantes. En effet, cette souche se caractérise par un temps de génération relativement court et de bons rendements de croissance.

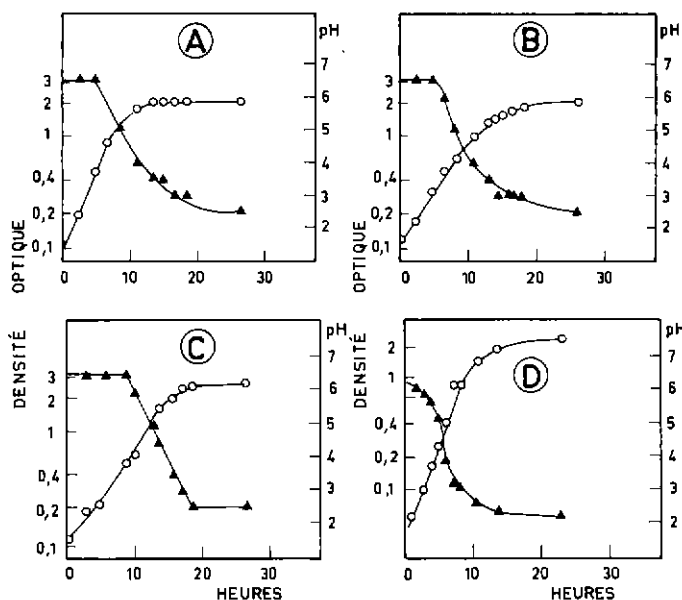


FIG. 1. — ○—○— Courbe de croissance de diverses souches de levures sur une solution de savons d'ammonium à 0,5 g/100 ml contenant Yeast Nitrogen Base Difco à 0,67 g/100 ml.
—▲— Variation du pH au cours de la croissance dans les divers milieux.
— A : *Candida tropicalis* CBS 5696.
— B : *Candida tropicalis* CBS 6320.
— C : *Candida utilis* CBS 5609.
— D : *Saccharomycopsis lipolytica* CBS 6317.

FIG. 2. — ○—○— Courbe de croissance de diverses souches de levures sur une solution de savons d'ammonium à 0,5 g/100 ml contenant Yeast Nitrogen Base Difco à 0,67 g/100 ml.
—▲— Variation du pH au cours de la croissance dans les divers milieux.
— A : *Candida lipolytica* YB 423-3.
— B : *Candida lipolytica* YB 423-12.
— C : *Candida rugosa* CBS 613.
— D : *Candida tropicalis* CBS 644.

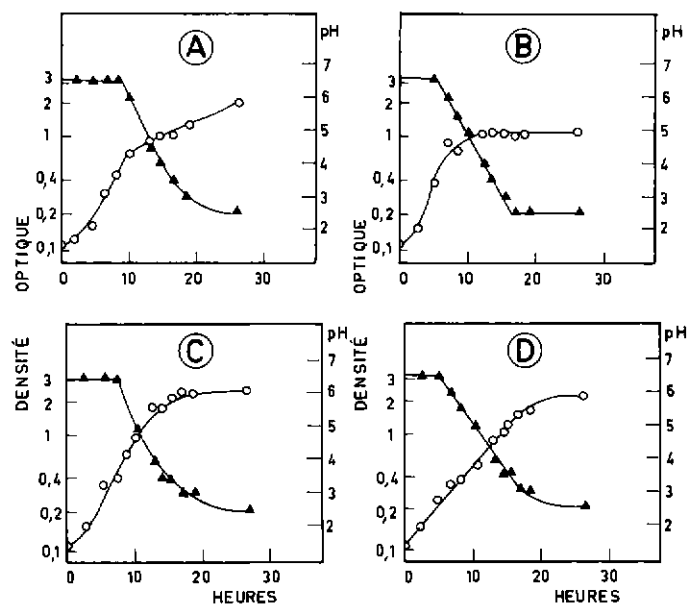


FIG. 3. — Influence du pH sur le taux népérien de croissance de *Candida lipolytica* YB 423-12 cultivée sur savons d'ammonium à la concentration initiale de 0,5 p. 100.

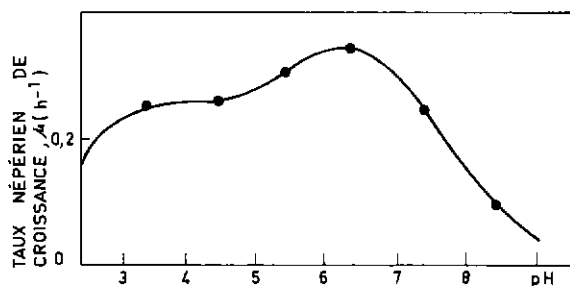


FIG. 4. — Influence de la température sur le taux népérien de croissance de *Candida lipolytica* YB 423-12 cultivée sur savons d'ammonium à la concentration initiale de 0,5 p. 100.

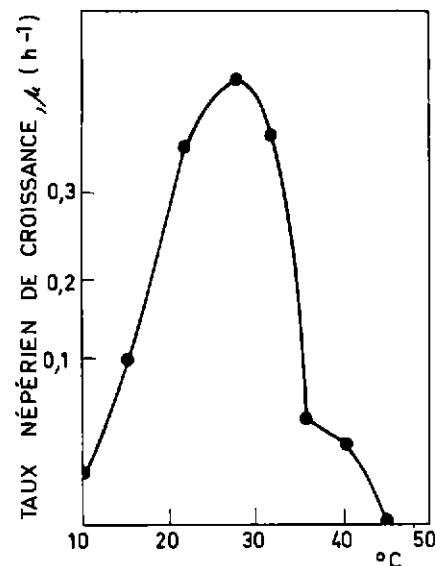


TABLEAU IV. — Composition en acides aminés et teneurs en protéines des souches de levure utilisées sur YNB/glucose

Souches de levures	<i>C. tropicalis</i> CBS 5696	<i>C. utilis</i> CBS 5609	<i>C. rugosa</i> CBS 613	<i>S. lipolytica</i> CBS 6317	<i>C. lipolytica</i> YB 423-12	<i>C. lipolytica</i> YB 423-3	<i>C. tropicalis</i> CBS 6320
Acides aminés							
Asp	10	11	12	11	11	11	12
Thr	6	6	6	6	6	6	6
Ser	6	6	8	6	6	6	6
Glu	14	12	12	12	12	12	17
Pro	3	4	4	4	5	4	3
Gly	6	5	6	6	6	6	5
Ala	7	7	8	8	8	8	7
Cys	1	1	1	1	1	1	1
Val	6	6	7	6	6	6	5
Ileu	5	5	4	5	5	5	4
Leu	8	9	7	8	8	8	7
Tyr	4	4	3	3	3	3	3
Phe	3	4	4	4	4	4	3
His	2	3	2	3	2	2	3
Lys	8	9	7	8	8	8	9
Arg	7	6	5	5	5	6	7
Trp	2	1	2	2	2	2	2
Teneur des cellules en protéines	41,35	45,30	31,57	41,69	42,17	40,84	39,42

Etude de l'action du pH.

Dans nos conditions opératoires, le pH final des cultures se situe aux environs de 2,5. Cette valeur de pH détermine très certainement l'arrêt de la croissance des souches.

Il n'est pas possible de travailler en présence de tampon, car l'addition de sels dans un milieu aqueux contenant des savons augmente la force ionique du milieu et provoque un relargage de savons. Cette étude a donc été réalisée en stabilisant la valeur du pH par ajouts répétés d'ammoniaque comme on le pratique normalement dans l'industrie.

La figure 3 montre que le pH a une faible influence sur la vitesse de croissance de cette souche pour des valeurs comprises entre 3,5 et 7,5. Cependant, il semble qu'à 6,5 la croissance est légèrement améliorée.

Il n'est pas sans intérêt de constater que la croissance est bonne à pH 3,5. Cette caractéristique est très importante car la culture à ce pH ne nécessite pas la stérilisation du milieu de fermentation dans les conditions industrielles. En effet, de nombreuses bactéries ne se développent pas à ce pH.

Etude de l'action de la température.

La figure 4 indique les variations du taux néperien de croissance de *Candida lipolytica* YB 423-12 en fonction de la température du milieu de culture. La température optimale pour la croissance de cette souche se situe aux alentours de 28 °C.

Croissance de *Candida lipolytica* YB 423-12 sur savons de sodium d'acides gras d'origines diverses.

Dans le but de généraliser les résultats obtenus sur savons de concret de palme, nous avons étudié la croissance de *Candida lipolytica* YB 423-12 sur des savons d'origines diverses. Les résultats, donnés dans le tableau V, montrent qu'il est possible de faire consommer à la levure avec un bon rendement différents types de savons.

TABLEAU V. — Paramètres de croissance de *Candida lipolytica* YB 423-12 cultivée sur savon de sodium provenant d'acides gras d'origines diverses

Substrats	Paramètres de croissance	Vitesse de croissance en heure	Rendements réels en matière sèche	Rendements réels en protéines
Savons de sodium d'huiles d'arachides		3	1,40	0,47
Pâtes de neutralisation d'huiles d'arachides		3	1,0	0,33
Savons de sodium de concret d'huiles de palme		3	1,48	0,5
Savons de sodium d'huile de colza		3	0,95	0,34

CONCLUSION

La culture de levures sur savons dérivant du concret de palme ou de sous-produits de raffinerie en vue de la production de protéines alimentaires est possible. La souche de *Candida lipolytica* YB 423-12 a un temps de génération de 2 h sur savons d'ammonium de concret de palme et 3 h sur savons de sodium provenant d'acides gras de sources diverses. Ses rendements de croissance sont meilleurs sur savons d'ammonium de concret de palme (12 en matière sèche et 0,75 en protéines) que sur les autres substrats. De plus, cette levure peut être cultivée à pH 3,5 avec une vitesse de croissance acceptable ($\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$). Dans ce cas, il ne sera pas nécessaire de travailler dans des conditions stériles car, à pH 3,5, de nombreuses bactéries sont éliminées.

La seule difficulté semble être liée aux différentes vitesses de métabolisation de divers acides gras. Il faudra donc, lors des fermentations, trouver des conditions de travail permettant une métabolisation totale du substrat.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] KLEIN J. M. (1979). — Etude sur le fractionnement de l'huile de palme. Obtention d'une huile fluide d'indice d'iode supérieur à 75 et caractéristiques des produits résultants, *Oléagineux*, 34, N° 11, p. 531-536.
- [2] COLON D. et SURRE Ch. (1979). — La place de l'huile de palme dans le marché mondial des corps gras. Historique et perspectives (bilingue français-anglais). *Oléagineux*, 34, N° 4, p. 163-172.
- [3] GRAILLE J., LOZANO P., GENESTRE P., GUIDA A., MORIN O. (1981). — Production d'hydrocarbures par craquage catalytique des sous-produits de l'huilerie de palme. *Rev. fr. Corps gras*, 28, N° 10, p. 421-426.
- [4] STRICKLAND L. H. (1951). — The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 698.
- [5] BA A., RATOMAHENINA R., GRAILLE J., GALZY P. (1981). — Etude de la croissance de quelques souches de levures sur les sous-produits du raffinage de l'huile d'arachide. Essais de valorisation des pâtes de neutralisation *Oléagineux*, 36, N°s 8-9, p. 439-445.
- [6] MARTINET F. (1982). — Production de levure aliment à partir du concret d'huile de palme *Thèse 3^e Cycle*, Univ. Sci. Techn. Languedoc, Montpellier, 120 p. roneo.
- [7] GROB K., GROB O., GROB J. R. (1977). — The barium carbonate procedure for the preparation of glass capillary columns. Further information and developments. *Chromatographia*, 10, 181.

SUMMARY

RESUMEN

Use of soaps to produce nutritional yeasts.

F. MARTINET, A. BA, R. RATOMAHENINA, J. GRAILLE and P. GALZY, *Oléagineux*, 1982, 37, N° 4, p. 193-198.

In the scope of valorization of by-products and wastes from vegetable oils refineries, it is proposed to grow food yeasts on soapstocks and on palm oil stearin converted into ammonium or sodium soaps. Growth parameters of different yeast strains have been determined. Results show that the studied strains are suitable for industrial production of single cell proteins from these substrates.

Utilización de jabones para la producción de levaduras alimenticias.

F. MARTINET, A. BA, R. RATOMAHENINA, J. GRAILLE y P. GALZY, *Oléagineux*, 1982, 37, N° 4, p. 193-198.

Dentro del aprovechamiento de los subproductos y desechos de refinarias de aceites vegetales, se propone cultivar levaduras alimenticias en las pastas de neutralización y en la estearina del aceite de palma previa transformación en jabones de amonio o sodio. Se estableció los parámetros de crecimiento de diferentes cepas de levaduras. Los resultados muestran que las cepas estudiadas son adecuadas a la producción industrial de proteínas de organismos unicelulares a partir de estos substratos.

